

1 0 1 7 2 1 2 0 0 4 / 0 0 0 0 0 0

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 15 JUL 2004

WIPO

PCT

EP04/6309

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

103 26 764.6

Anmeldetag:

13. Juni 2003

Anmelder/Inhaber:

Prof. Dr. Dr. Stephan N e e s ,
81375 München/DE

Bezeichnung:

Endothel-protective Perfusionslösung, eine
Apparatur und Verfahren zur Konservierung des
Endothels in isolierten Hohlorganen und
biologischen Gefäßen

IPC:

A 01 N 1/02

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 23. Juni 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

BEST AVAILABLE COPY

Hintermeier

Endothel-protective Perfusionslösung, eine Apparatur und Verfahren zur
Konservierung des Endothels in isolierten Hohlorganen
und biologischen Gefäßen

Die Erfindung betrifft eine Endothel-protective Perfusionslösung, eine Apparatur und ein Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung von isolierten Hohlorganen, insbesondere isolierten biologischen Gefäßen, wie Blutgefäßen und Lymphgefäßen, sowie die Verwendung der Endothel-protective Perfusionslösung zur Vorbereitung von Hohlorganen bzw. biologischen Gefäßen als Transplantat zur Behandlung von Organ- oder Gefäßerkrankungen und die Verwendung der Endothel-protectiven Perfusionslösung zur Reparatur von Endothelläsionen in isolierten Hohlorganen und/oder biologischen Gefäßen.

Ein durch Arteriosklerose hervorgerufener Verschluss von Blutgefäßen ist in vielen westlichen Ländern Ursache für eine Vielzahl von Organerkrankungen. Eine Gefäßtransplantation, d.h. der Austausch von kranken, verengten oder verschlossenen biologischen Gefäßen durch gesunde, hat daher für die Behandlung solcher Erkrankungen einen hohen klinischen Stellenwert. So sterben beispielsweise alleine in der Bundesrepublik Deutschland etwa 200 000 Menschen pro Jahr an einem Herzinfarkt in Folge eines arteriosklerotischen Verschlusses einer oder mehrerer Koronararterien.

Ein weiteres durch Arteriosklerose verursachtes und weit verbreitetes Krankheitsbild ist die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). Etwa 5-10% der Erwachsenen leiden an peripheren arteriellen Durchblutungsstörungen, was drastische Maßnahmen an den Patienten, wie eine Amputation an Gliedmaßen, bei etwa 35 000 Menschen pro Jahr in der Bundesrepublik Deutschland erforderlich macht. Durch eine rechtzeitige chirurgische Überbrückung der krankhaft veränderten biologischen Gefäßen mit einem geeigneten Gefäßersatz, können auch in solchen Fällen die Patienten bzw. deren Gliedmaßen behandelt und gerettet werden.

In der Bypass-Chirurgie finden verschiedene Gefäßersatzmaterialien Verwendung, die entsprechend ihrer Herkunft in drei Hauptgruppen eingeteilt werden können: 1. autologer (= körpereigener) Gefäßersatz, 2. Bioprothesen und 3. Kunststoffprothesen. Dabei können die beiden ersten Materialien unter dem Begriff „Biologischer Gefäßersatz“ zusammengefasst werden. Bei den Bioprothesen lässt sich wiederum zwischen homologen (aus der gleichen Spezies gewonnenen) und heterologen (aus einer fremden Spezies gewonnenen) Gefäßprothesen unterscheiden. Bei den Kunststoffprothesen handelt es sich um einen alloplastischen (allo = anders, fremd) Gefäßersatz, bei dem inerte, poröse Kunststoffe wie Polyester (Dacron) oder PTFE (Teflon) verwendet werden.

Das wichtigste und am meisten bevorzugte Ausgangsmaterial in der Gefäßchirurgie, insbesondere in der Bypass-Chirurgie, sind autologe Transplantate. Bei den biologischen Gefäßen sind dies hauptsächlich die *Vena saphena magna* oder die *Arteria thoracica interna* (= *Arteria mammaria int.*). Beide Gefäße finden vorzugsweise in der Koronarchirurgie Anwendung. Die Verwendung von körpereigenen Gefäßen liefert im Vergleich zu anderen Gefäßtransplantaten die besten Resultate im Hinblick auf die sogenannten „Offenheitsraten“. Darunter versteht man die Anzahl der nach einer gegebenen Zeitspanne noch offenen Gefäße nach einer Gefäßtransplantation.

In der Koronarchirurgie sind immerhin 80-95% der *Arteria mammaria int.*-Bypässe, aber nur 65-80% der verwendeten Venen-Bypässe nach 5 Jahren noch offen. Dabei ist zu beachten, dass 20% der transplantierten biologischen Gefäße schon innerhalb des ersten Jahres nach der Implantation lebensbedrohlich verengt bzw. verschlossen sind. Wiederkehrende Operationen sind bereits nach 10 Jahren in 8-16% der Fälle bei Venen-Bypässen und in etwa 8% bei *Arteria mammaria int.*-Bypässen erforderlich.

Diese Zahlen verdeutlichen, dass selbst die Verwendung eines autologen Gefäßersatzes, der gegenüber den anderen Gefäßprothesenarten eine Reihe Vorteile aufweist, in der chirurgischen Praxis immer noch mit erheblichen Ausfällen verbunden ist und kann damit kein zufriedenstellendes Ergebnis darstellen. Aufgrund der beobachteten Ausfälle bei den transplantierten Gefäßen, erscheint also eine Verbesserung des üblichen chirurgischen Vorgehens dringend erforderlich. Immerhin ist ein offenes und gut funktionierendes

biologisches Gefäß für den Organismus lebensnotwendig und entscheidet in fast allen Fällen über Tod oder Leben der Patienten.

Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben neue grundlagenwissenschaftliche Erkenntnisse, die zeigen, dass der Grund für die akute Thrombosierung von biologischen Gefäßen wie auch die durch die intimale Wandverdickung verursachte Restenose mit den damit verbundenen hohen Ausfallraten auf die in der heute noch üblichen chirurgischen Praxis im Umgang mit biologischen Gefäßen vor Gefäßtransplantationen zurückzuführen ist.

Untersucht man chirurgisch entnommene *Vena saphena*-Segmente, so lässt sich – unabhängig von den jeweiligen Zentren – fast durchweg eine erschreckend schlechte Erhaltung vor allem ihres luminalen Endothels feststellen. Mehr als 50% der Gefäße besitzen überhaupt kein luminales Endothel mehr. Der Grund liegt darin, dass die autologen Gefäßtransplantate vor der Gefäßtransplantation üblicherweise unter starken mechanischen Beanspruchungen mit Saline („physiologische Kochsalzlösung“) behandelt werden, um die Gefäße blutfrei zu bekommen und um ihre Dichtigkeit zu überprüfen. Diese Behandlung führt jedoch zu einer Beeinträchtigung der Endothelfunktion bis hin zur Zerstörung des Endothel-Gewebes. Es muss bedacht werden, dass bei der Verwendung von Saline kein ausreichender Erhaltungsstoffwechsel mehr im Endothel stattfindet.

Des Weiteren werden die biologischen Gefäße bei der Behandlung mit Saline starken mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt, indem die Gefäße, ähnlich einem gefalteten Schlauch, über eine dicke Knopfkannüle gezogen und mit der Saline-Lösung sowie einer angesteckten Spritze unter einem unkontrollierbaren hohen Druck gesetzt werden. Anschließend wird das Gefäß Stück für Stück zur Erkennung der Gefäß-Seitenäste, aus denen in diesem Moment Flüssigkeit heraustritt, von der Knopfkannüle heruntergeschoben und die Seitenäste mit entsprechenden Klemmen sofort ligiert. Schließlich wird das fertig für Transplantationszwecke präparierte Gefäßsegment in seiner gesamten Länge noch einmal unter hohem Druck gesetzt, was mit einem regelrechten „Aufblasen“ des Gefäßes verbunden ist. Durch den hohen Druck dem das Gefäß ausgesetzt ist wird häufig der letzte Rest der luminalen Endothel-Schicht abgerissen und weggespült.

Damit wird deutlich, dass durch diese in der chirurgischen Praxis übliche Behandlung der biologischen Gefäße die innerste Wand der Gefäßtransplantate, die Intima (= *Tunica intima*)

und deren luminales Endothelgewebe, stark beschädigt wird. Die Intima besteht aus einschichtigen Endothel und dem *Stratum subendotheliale* (feines lockeres Bindegewebe mit von den Erfindern entdeckten subendothelialen Perizyten) sowie der gefensterten Membrana elastica interna und erfüllt wichtige biologische Funktionen die für den Erhalt der Gefäßfunktion essentiell sind.

Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben festgestellt, dass dem luminalen Endothelgewebe größte Bedeutung sowohl im Hinblick auf den akuten Erhalt der Gefäßfunktion (Freihaltung von thromboembolischen Reaktionen zum Zwecke einer ungehinderten Flüssigkeitsleitung), als auch im Hinblick auf die längerfristige Freihaltung des Gefäß-Lumens (Verhinderung von arteriosklerotischen Stenosen und schließlich Thromboembolie) zukommt.

Eine Zerstörung der Endothel-Schicht – wie zum Beispiel durch die oben geschilderte Behandlung von autologen Gefäßtransplantaten, begünstigt eine Thrombosierung des betroffenen Gefäßes. Es ist bekannt, dass nur eine geschlossene, gesunde und somit auch stoffwechselaktive Endothelauskleidung durch komplexe „anti-aggregatorische“ (Thrombozyten-hemmende), „anti-koagulatorische“ (gerinnungshemmende) und „pro-fibrinolytische“ (Fibrin-auflösende) Aktivitäten in ständiger Weise das Zustandekommen von thrombotischen Ablagerungen innerhalb des Kreislaufsystems eines Organismus verhindert.

Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben hinreichende Belege dafür, dass im Bereich von Endothelläsionen, in denen die erwähnten antithrombogenen Funktionen natürlich nicht mehr ausgeübt werden können, auch noch auf zusätzliche Weise zur Thrombosierung neigt. In der Intima aller großen Blutgefäße liegen nämlich subendothelial lokalisierte, „Perizyten-ähnliche“ Zellnetze, die extrem hohe Konzentrationen des sogenannten „Gewebefaktor“ (TF = „Tissue Faktor“) exprimieren. Der Gewebefaktor (TF) ist ein integrales membranständiges Glykoprotein, das beim Menschen von diesem Zelltypus konstitutiv exprimiert wird. Dieses Membranprotein übernimmt bei der Blutgerinnung als ein Co-Faktor des aktivierten Faktors V \bar{H} (FV \bar{H} a) eine entscheidende Funktion und ist neueren Erkenntnissen nach für die Auslösung fast aller klinisch relevanten Thrombosierungsprozesse verantwortlich. Ein gesundes, geschlossenes Endothel schirmt den von den Perizyten produzierten Gewebefaktor physiologischerweise vollständig von dem innerhalb der Gefäße strömenden Blut ab. Durch die damit erreichte Abschirmung des Gewebefaktors vom Blutstrom durch das

zwischengeschaltete intakte Endothel-Gewebe wird einer akuten Thrombosierung und somit einem akuten Verschluss der biologischen Gefäße vorgebeugt. Dies verdeutlicht vor allem, dass die kurzfristig (akute) Offenheitsrate eines biologischen Gefäßes ganz wesentlich von dem Zustand des Endothel-Gewebes innerhalb des Gefäßes abhängt.

Dabei muss bedacht werden, dass die Schaffung einer geschlossenen Endothelabdeckung kein einmaliges Ereignis ist, sondern dass diese ständig auch gegen die hohen Scherkräfte des Blutes aufrecht erhalten werden muß. Im Einzelnen spielen auch hier wieder aktive Stoffwechselleistungen des Endothelgewebes eine entscheidende Rolle. Dazu gehören zum Beispiel ständige Verfüngungsprozesse, d.h. das Verschließen der dichten Interzellularspalten durch spezielle Proteine sowie kontinuierliche Zellteilungsprozesse, die vor allem für die Abdeckung und Reparatur von Läsionen an der intimalen Oberfläche notwendig sind.

Von den Erfindern der vorliegenden Erfindung wurde außerdem erkannt, dass die ständige (chronische) Erhaltung und die Regenerationsfähigkeit von Endothel-Gewebe auch für die längerfristige Funktion der Gefäßwand und somit der biologischen Gefäße essentiell sind. Eine intakte und dichte Endothel-Schicht ist nämlich zur Schaffung und Aufrechterhaltung eines speziellen Milieus in der Intima zur Kontrolle der subendothelialen Zellverbände notwendig. Diese Zellverbände erstrecken sich unterhalb des Endothels als dünnes Netzwerk, die bei Gefäßwandverletzungen zwar sofort hämostatisch reaktionsbereit sind, das Lumen aber in keinerlei Weise einschränken. Wird das Endothel aber verletzt oder erkrankt dieses Gewebe, gelangen Wachstumsfaktoren aus dem Plasma in die tieferen Intima-Schichten, mit der Folge einer massiven und weiter zunehmenden Proliferation der subendothelialen Zellverbände. Die Folge davon ist eine langfristig ablaufende zunehmende sklerotisierende Umformung der Wand des biologischen Gefäßes, eine Einengung des Lumens und schließlich die chirurgisch gefürchtete Restenosierung. Unter „Restenosierung“ versteht man hierbei die Verengung von Gefäßtransplantaten was mit einem erneuten Verlust der Durchblutung im abhängigen Gewebereich verbunden ist.

Aus all dem wird deutlich, dass die bisher auf gefäßchirurgischem Gebiet verwendeten und beschriebenen Verfahren zur Behandlung von isolierten Hohlorganen bzw. biologischen Gefäßen den Nachteil haben, dass sie zu einer Beeinträchtigung bzw. Zerstörung des Endothel-Gewebes führen, was wiederum zu einer schnell oder langfristig bewirkten

Restenosierung führt. Als Folge ist ein erneuter chirurgischer Eingriff in Patienten notwendig, die nun natürlich auch eine deutlich verschlechterte Prognose haben.

Die Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde ein schonendes Verfahren zur Behandlung von isolierten Hohlorganen bzw. biologischen Gefäßen zur Verfügung zu stellen, das eine Konservierung, d.h. eine Aufrechterhaltung und gegebenenfalls auch eine Regeneration der Endothel-Schicht der Gefäße ermöglicht, um auf diese Weise zuverlässige und langfristig einsetzbare Gefäßtransplantate zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch den Gegenstand der Ansprüche 1-26 gelöst. Somit betrifft die Erfindung eine Endothel-protective Perfusionslösung, umfassend

- (a) physiologische Elektrolytlösung
- (b) mindestens 0,1 Gew.-% natives Albumin
- (c) 0,5 bis 10 mM L-Glutamin

Unter dem Begriff „Endothel“ versteht man die einschichtige zellige Auskleidung der biologischen Gefäße und serösen Höhlen.

Unter dem Begriff „Endothel-protective Perfusionslösung“ versteht man eine Lösung mit der das Endothelgewebe in Hohlorganen bzw. biologischen Gefäßen behandelt werden kann und dabei das Endothelgewebe erhalten bleibt. Eine Ablösung oder Zerstörung des Endothels wird durch die Endothel-protective Perfusionslösung verhindert. Insbesondere wird durch die Endothel-protective Perfusionslösung die Teilungsfähigkeit der Endothelzellen sowie die Regenerationsfähigkeit des Gewebes aufrechterhalten. „Endothel-protectiv“ bedeutet daher, dass das Endothel seine Gewebearchitektur behält.

Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben, wie oben beschrieben, überraschenderweise festgestellt, dass die Endothel-Schicht von biologischen Gefäßen für die Erhaltung der Gefäße - auch nach der Transplantation - einen entscheidenden Faktor darstellt.

Mit der erfindungsgemäßen Perfusionslösung können sämtliche Endothel-tragende biologische Gefäße und Hohlorgane behandelt werden, so dass die Struktur und Funktion vor allem der Endothel-Gewebe aufrechterhalten bleibt.

Unter dem Begriff „Hohlorgan“ sollen im Folgenden ganz allgemein Orangefäßsysteme in Herz, Darm, Uterus, Niere, Harnblase, Lunge, Leber, Milz etc verstanden werden. Der Begriff „Hohlorgan“ schließt aber auch sämtliche biologischen Gefäße ein, wie Blutgefäße (Arterien und Venen) und Lymphgefäße.

Ein funktionales und strukturell intaktes Endothel-Gewebe ermöglicht eine lange Lebensdauer all dieser Gefäß-Prothesen, da auf diese Weise einem Verschluss der Gefäße, zum Beispiel durch Thrombosierung oder sklerotisierende Restenose vorgebeugt wird.

Die Erfindung betrifft auch eine Apparatur mit der ein isoliertes biologisches Gefäß mit der Endothel-protectiven Perfusionslösung durchgespült werden kann. Mit dieser Apparatur können biologische Gefäße einfach und effizient auf ihre Dichtigkeit überprüft werden. Zudem können zum Beispiel alle Seitenäste des biologischen Gefäßes beim Durchspülen mit geeigneten Ligationshilfen, wie zum Beispiel Klemmen oder Micro-Clips, zielsicher entdeckt und ligiert werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung von Hohlorganen bzw. biologischen Gefäßen, bei dem das Hohlorgan mit der Endothel-protectiven Perfusionslösung durchgespült wird. Für dieses Verfahren kann vorzugsweise die erfindungsgemäße Apparatur eingesetzt werden.

Die Endothel-protective Perfusionslösung eignet sich zur Verwendung zur Vorbereitung von biologischen Gefäßen als Transplantat für die Behandlung von Gefäßkrankheiten, wie zum Beispiel Angiopathie, Vaskulitis, insbesondere Arterien- und Venenstenosen, Angina pectoris, Myokardinfarkt, (Herzinfarkt), Apoplexie (Schlaganfall), Hörsturz, Aneurysma, Atherosklerose, Thrombose, Varikose, Thrombophlebitis, Claudicatio, Raucherbein und Gangrän.

Die Endothel-protective Perfusionslösung eignet sich weiterhin zur Reparatur von Endothelläsionen bei Orangefäßsystem in Hohlorganen bzw. in biologischen Gefäßen.

Die mit der Endothel-protectiven Perfusionslösung behandelten Hohlorgane bzw. biologischen Gefäßen weisen eine verlängerte Offenheitsrate der Gefäße im Vergleich zu

unbehandelten oder mit herkömmlicher physiologischer Kochsalzlösung bzw. Saline behandelten Gefäße auf.

Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren behandelten Hohlorgane bzw. biologische Gefäße haben den wesentlichen Vorteil, dass auf ihrer Innenoberfläche ein intaktes, gesundes Endothel-Gewebe aufweisen.

Weiterhin stellt man bei einem beschädigten Endothel durch die Behandlung mit der erfindungsgemäßen Perfusionslösung eine Regeneration des Endothelgewebes fest. Die Endothelzellen behalten ihre Teilungsfähigkeit und sind so sogar in der Lage, Endothelläsionen der Hohlorgane bzw. biologischen Gefäße zu reparieren. Unbehandelte oder in der chirurgischen Praxis mit herkömmlicher physiologischer Kochsalzlösung behandelten Gefäße führen dagegen zu einer Läsion oder sogar einer kompletten Ablösung des Endothels bereits innerhalb der ersten Stunde.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren ist es weiterhin möglich, dass das mit der Endothel-
protektiven Perfusionslösung behandelten Hohlorgan bzw. biologische Gefäß für längere Zeit, d.h. bis zu mehreren Tage aufbewahrt werden kann. Dies ermöglicht eine einfache Lagerung der Gefäße und erleichterte logistische Versorgung bei Bypass-Operationen sowie eine bessere Planbarkeit derartiger Eingriffe.

Die erfindungsgemäße Endothel-protektive Perfusionslösung umfasst eine physiologische Elektrolytlösung, mindestens 0,1 Gew.-% natives Albumin und 0,5 bis 10 mM L-Glutamin.

Als physiologische Elektrolytlösung wird vorzugsweise eine den normalen anorganischen Salzbestandteilen des gesunden humanen Blutplasmas entsprechende Elektrolytlösung verwendet. In einer Ausführungsform der Erfindung wird der Bicarbonatanteil herkömmlicher Elektrolytlösungen durch äquimolares Histidinchlorid ersetzt.

Die erfindungsgemäße physiologische Elektrolytlösung hat die folgende Zusammensetzung: 100-150 mM NaCl; 1-15 mM KCl; 0,1-4 mM MgSO₄; 0,5-2 mM KH₂PO₄; 24-48 mM Histidin-Cl und 1-3 mM CaCl.

Eine bevorzugte Zusammensetzung der physiologischen Elektrolytlösung ist: 127 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,1 mM MgSO₄; 1,2 mM KH₂PO₄; 24 mM Histidin-Cl; 2 mM CaCl. In atmosphärischer Luft wird der pH-Wert der physiologischen Elektrolytlösung vorzugsweise auf den Normalwert des arteriellen Blutes (pH = 7,4 +/- 0,04) eingestellt. Die Einstellung des pHs erfolgt vor der Zugabe von CaCl als zuletzt zugesetzte Komponente der Lösung. Aber auch jede andere Lösung, die als physiologische Elektrolytlösung verwendet werden kann, kommt in der vorliegenden Erfindung in Betracht.

Zur Energieerhaltung des endothelialen Stoffwechsels sind in der physiologischen Elektrolytlösung Energiesubstrate, vorzugsweise 2-10 mM Glukose und 1-10 mM Pyruvat, enthalten. Diese Energiesubstrate alleine ermöglichen eine vollkommen ausreichende Bereitstellung von Stoffwechselenergie für das Endothelgewebe, selbst unter nahezu hypotoxischen Bedingungen ($pO_2 \geq 10$ mm Hg). Bevorzugte Konzentrationen der Energiesubstrate sind 8 mM Glukose und 2 mM Pyruvat. Die physiologische Elektrolytlösung enthält in einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Perfusionslösung Heparin in einer gerinnungshemmenden Konzentration. Übliche gerinnungshemmende Konzentrationen für hochmolekulares Heparin sind 0,2-0,6 U/ml, vorzugsweise 0,4 U/ml im Falle von Humanblut. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung verwendet niedermolekulares Heparin, wie zum Beispiel von PharmaciaTM zu 100 µl/100 ml. Weiterhin können jeweils 50-100 µM Harnsäure und/oder Ascorbat als exogene Reduktionsmittel gegen reaktionsfreudige Sauerstoffverbindungen (Antioxidantien) zugesetzt werden.

Eine Menge von bereits 0,1 Gew.-% nativem Albumin führt zu einer beträchtlichen Stabilisierung des Endothel-Gewebes. „Natives Albumin“ bedeutet, dass das Albumin in seiner natürlichen Form (nativen) vorliegt und bevorzugt durch chromatographische Verfahren aufgereinigt wird. Bevorzugt natives Human-Albumin. Experimentell lässt sich die Wirkung von Albumin auf die Stabilisierung des Endothelgewebes im Phasenkontrast und mit Zeitrafferkinematographie ermitteln (siehe Beispiel 2). Dabei hat sich natives Albumin im Vergleich zu hitzebehandeltem Albumin als eindeutig vorteilhaft herausgestellt.

Die Dichtigkeit des Endothelrasens kann durch Bestimmung der hydraulischen Konduktivität (L_p [cm/s/cm H₂O]) quantitativ gemessen werden. Im Vergleich zu den mit der erfindungsgemäßen Perfusionslösung behandelten Endothel-Schichten, verlieren die in Saline

behandelten Endothel-Schichten ihre Dichtigkeit vollkommen, weil sich die Einzelzellen sehr schnell kugelig von der Oberfläche ablösen.

Eine weitere Ausführungsform der Endothel-protectiven Perfusionslösung der Erfindung enthält den Zusatz von hämolysinfreiem oder autologem Serum. In diesem Fall muß kein zusätzliches natives Albumin zugesetzt werde, da dieses durch das Serum bereitgestellt wird.

Eine über Tage nicht abnehmende Stabilisierung der nativen Dichtigkeit der Endothel-Zellen lässt sich erreichen, wenn der Elektrolytlösung hämolysinfreies oder autologes Serum zugesetzt wird. Das Serum ist bevorzugt frei von Lipoprotein. Unverdünntes autologes Serum besitzt eine Albuminkonzentration von mindestens 6 Gew.-%, das entsprechend der erfindungsgemäßen Perfusionslösung auch bei stärkerer Verdünnung die Aufgaben des nativen Albumins übernehmen kann. Ausserdem enthält humanes Serum zahlreiche Wachstumsfaktoren in wirksamen Konzentrationen (z.B. jeweils > 0,1 ng/ml bFGF, TGF, VEGF). Der Endothel-protectiven Perfusionslösung wird eine Konzentration von 1-10 Vol-% hämolysinfreies oder autologes Serum zugesetzt. Vorzugsweise beträgt die Serumkonzentration 5-10 Vol-%. Schon bei 1 Vol-% autologem oder hämolysinfreiem Serum lässt sich aber eine erkennbare Verbesserung der Stabilisierung der Endothel-Dichtigkeit feststellen. Besondere Ausführungsformen der Erfindung haben eine Serum-Konzentration von 2,5 Vol-%, 5 Vol-% oder 10 Vol-%.

Das in der Endothel-protectiven Perfusionslösung enthaltene L-Glutamin kann in verschiedenen Ausführungsformen der Erfindung eine Konzentration von 2,5 mM, 5 mM oder 7,5 mM haben, wobei eine Konzentration von 2,5 mM L-Glutamin bevorzugt ist.

Bei einer weiteren Ausführungsform der Erfindung enthält die Endothel-protective Perfusionslösung zusätzlich Antibiotika in bakteriziden Konzentrationen. Bevorzugt sind zum Beispiel 100-400 U/ml Penicillin und/oder 0,1-0,4 mg/ml Streptomycin, wobei 200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin am meisten bevorzugt sind.

Die fertige Lösung kann ohne Wirkungsverlust monatelang bei einer Temperatur von 4 °C und in völliger Dunkelheit gelagert werden. Eine Sterilisation zur Freihaltung von Keimen in der Lösung kann zum Beispiel über Sterilfilter erfolgen.

Die erfindungsgemäße Apparatur zur Endothel-konservierenden Behandlung von isolierten biologischen Gefäßen umfasst gemäß Figur 1 eine Kammer (1), einen axial beweglichen Stempel (6), eine Kanüle (5), einen Vorratsbehälter (7), der Endothel-konservierende Perfusionsflüssigkeit enthält und eine Dichtungsvorrichtung (3), wobei die Kanüle mit dem axial beweglichen Stempel (6) verbunden ist, so dass diese mit dem Stempel in die Kammer bewegt werden kann und wobei die Dichtungsvorrichtung (3) ein Ende des biologischen Gefäßes umschließen kann und die Kanüle mit dem anderen Ende des Gefäßes verbunden werden kann, so dass die Endothel-protective Perfusionslösung aus dem Vorratsbehälter (7) selektiv, vorzugsweise unter einem Druckgradienten, in das biologische Gefäß geleitet.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Apparatur der Erfindung umfasst die Dichtungsvorrichtung verformbare Dichtungsscheiben, die stapelförmig in einer Rändelschraube angeordnet sind.

Vorzugsweise sind die stapelförmig in der Rändelschraube angeordneten Dichtungsscheiben anpreßbar und durch perforierte Zwischenscheiben, zum Beispiel Stahlscheiben getrennt. Die Stahlscheiben haben vorzugsweise eine Dicke von 0,5–2 mm. Die gestapelten Dichtungsscheiben sollen durch die perforierten Stahlscheiben auf Abstand gehalten werden. Vorzugsweise soll der Durchmesser der Zwischenscheibenöffnungen 1-2 mm kleiner sein als der Durchmesser der jeweils ausgewählten Dichtungsscheiben.

Vorzugsweise haben die Dichtungsscheiben einen Durchmesser, der an die Größe des abzudichteten Gefäßes angepasst ist. Der Durchmesser des Gefäßes ist dabei kleiner als der Durchmesser der Dichtungsscheiben, so dass die Gefäße im Durchtrittsbereich der Dichtungsscheiben von diesen eng umschlossen werden, wobei aber das Lumen der unter Druck gefüllten und dadurch geweiteten Gefäße nicht verschlossen wird.

Der Durchmesser der Dichtungsscheiben kann an den Außendurchmesser des Gefäßes durch Zusammenpressen der verformbaren Dichtungsscheiben angepasst werden. Im Falle von Blutgefäßen beträgt der Durchmesser der Dichtungsscheiben vorzugsweise 1-10 mm und/oder eine Dicke von 0,3-3 mm. Bei Hohlorganen entsprechen die Gefäße den zuleitenden Arterien bzw. den abführenden Venen des Organgefäßsystems in dem jeweiligen Hohlorgan. Bevorzugtes Material der Dichtungsscheiben ist Silikon oder jedes andere zu Abdichtung

verwendbare und verformbare Material. Die perforierten Stahlscheiben bestehen bevorzugt aus Stahl, zum Beispiel V2A-Stahl.

Eine bevorzugte und in Figur 1 gezeigte Ausführungsform der Apparatur der Erfindung enthält eine Kammer (1) und Silikon-Dichtungsscheiben (3) mit einer zentralen Perforation die in einer Rändelschraube angeordnet sind. Die Kammer ist bevorzugt zylinderförmig. Durch die Perforation in den Dichtungsscheiben wird das eine Ende eines Blutgefäßes (1) (z.B. Arterie oder Vene) zunächst nur ein kurzes Stück hindurchgezogen und mit einer Klemme verschlossen. Da andere Ende des Gefäßes wird mit der Kanüle (5) des Stempelteiles verbunden. Die Kanüle ist vorzugsweise mit einem Schlauch verbunden, der wiederum mit dem Vorratsbehälter (7) verbunden ist. Der Vorratsbehälter enthält die erfindungsgemäße Endothel-protektive Perfusionslösung und kann zum Beispiel eine Boyle Mariott'sche Flasche sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird mit Hilfe eines zwischen dem Vorratsbehälter und der Kammer bestehenden Druckgradienten (Δp) die Perfusionslösung bei einem definierten und konstanten Druck aus dem Vorratsbehälter in die Kanüle und damit in das Blutgefäß geleitet. Der einfachste Fall zur Erzeugung eines natürlichen Druckgradienten ist ein hydrostatischer Höhenunterschied, zum Beispiel durch die Positionierung der Vorratsflasche in ca. 1,30 m Höhe oberhalb der Kammer. Anschließend wird der axial bewegliche Stempel (6) mit dem vorgeschalteten Blutgefäß abgedichtet in den Innenraum der Kammer eingeschoben.

Wird nun unter mäßigem Druck die Endothel-protektive Perfusionslösung in das Gefäß appliziert, kann es zum Ausströmen der Perfusionsflüssigkeit über die Seitenäste des Gefäßes kommen. Das Ausspritzen von Flüssigkeit aus den Seitenäste des Gefäßes im Kammerinnenraum nimmt rasch aufgrund des dort sich aufbauenden Gegendruckes ab. Durch weiteres Eindrehen der Rändelschraube im Dichtungsbereich gelingt es weitgehend, den Zylinderinnenraum im Ausführungsbereich des Gefäßes abzudichten, so dass das Ausströmen über die in diesem Bereich liegenden Seitenäste bald unterbleibt. Zieht man nun das Blutgefäß vorsichtig gedichtet nach vorne weiter durch die Perforation der Dichtungsscheiben, kommt es zum selektiven Ausspritzen von Perfusionslösung aus allen neu heraustretenden Seitenästen (8), die dann jeweils sofort ligiert mit Ligationshilfen (9) werden können. So lässt sich diese chirurgisch unabdingbare Dichtigkeitsprüfung von biologischen

Gefäßen, vor allem die die für einen arteriellen Bypass vorgesehen sind, sehr schonend für das Endothel und bei einem definierten und konstanten Druck abwickeln. Außerdem lässt sich sehr sauber arbeiten, d.h. Überschwemmungen wie bei der oben beschriebenen Verwendung von Saline unterbleiben. Schließlich wird das Gefäß ganz aus dem Gefäß herausgezogen und durch Anwendung eines Perfusionsdruckes (z.B. 250 mm Hg) noch einmal in seiner ganzen Länge auf Dichtigkeit überprüft. Anschließend kann es bis zur Transplantation, vorzugsweise bei einer Temperatur von 37°C, in die protektiven Perfusionslösung eingelegt werden.

In einer weiteren Ausführungsform wird die erfindungsgemäße Perfusionsflüssigkeit zusätzlich über eine Durchlaufspirale eines Thermostatisierungssystems geleitet, so dass die Perfusionsflüssigkeit vorzugsweise auf 37°C erwärmt werden kann.

Die Apparatur kann zusätzlich eine oder mehrere Entlüfterschrauben enthalten, die an der Kammer angebracht sind und zur Entlüftung bzw. Entleeren des Kammerinhalts dienen.

Die erfindungsgemäße Apparatur eignet sich für sämtliche biologische Gefäße wie Blutgefäße (Arterien und Venen) und Lymphgefäße. Eine Anwendung der Apparatur zur Endothelkonservierenden Behandlung von Blutgefäße insbesondere in Hinblick auf die Bereitstellung von Gefäßen für die Gefäßtransplantation bzw. Bypass-Operation ist hierbei bevorzugt.

Die erfindungsgemäße Apparatur ermöglicht in vorteilhafter Weise einen konstanten Druckgradienten über die Gefäßwand, was ein Kollabieren des Gefäßes mit einhergehender Zerstörung des Endothel-Gewebes verhindert.

Mit Hilfe der Rändelschraube und den darin enthaltenen Dichtungsscheiben kann der Anpressdruck auf das Gefäßsegment variiert werden und so die Dichtigkeit reguliert werden.

Der Stempel bewegt sich vorzugsweise axial, d.h. durch die Kammer in Richtung der Dichtungsvorrichtung.

Neben den oben erwähnten Vorteilen ermöglicht die erfindungsgemäße Apparatur eine genaue und gleichmäßige Behandlung des Gefäßes mit der erfindungsgemäßen Perfusionsflüssigkeit. So ermöglicht die Apparatur eine gleichmäßige Versorgung der Endothelzellen mit Perfusionsflüssigkeit. Dies ermöglicht den Austausch von biologisch

wichtigen Stoffwechselformen die zum Erhalt bzw. für die Proliferation der Endothelzellen notwendig sind.

Die Apparatur eignet sich besonders zur Dichtigkeitsprüfung von biologischen Gefäßen. Hierbei wird ein Gefäßsegment über die Dichtungsscheiben herausgezogen und Stück für Stück auf Dichtigkeit überprüft. Die dabei festgestellten Gefäßabgänge können dann mit geeigneten Ligationshilfen, wie z.B. Klemmen oder Micro-Clips ligiert werden. Erfindungsgemäß werden auch kleinste Seitenäste über ausspritzende Perfusionsflüssigkeit leicht entdeckt und können unter Druckkontrolle effizient ligiert werden. Schließlich kann auch das vollständig aus der Apparatur herausgezogene Gefäß noch einmal in seiner Gesamtheit auf Dichtigkeit bei einem adäquaten Druck überprüft werden (Δp mindestens 180 mm HG).

Die erfindungsgemäße Perfusionslösung kann daher in einem Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung von Hohlorganen bzw. biologischen Gefäßen eingesetzt werden. Hierbei werden die Hohlorgane bzw. biologischen Gefäße mit der erfindungsgemäßen Perfusionslösung durchgespült.

Das Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung von Hohlorganen umfasst bevorzugt die Verwendung der erfindungsgemäßen Apparatur, mit der die Perfusionsflüssigkeit durch das Hohlorgan geleitet wird.

Die nachfolgenden Figuren dienen der Erläuterung der Erfindung.

Figur 1 zeigt eine Apparatur zur Verwendung bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung isolierten biologischen Gefäßen.

Figur 2 zeigt eine kultivierte Endothel-Schicht aus der *Vena saphena* im Verlauf einer Inkubation mit Saline.

Figur 3 zeigt eine kultivierte Endothel-Schicht aus der *Vena saphena* im Verlauf einer Inkubation mit einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Perfusionslösung.

Figur 4 zeigt eine kultivierte Endothel-Schicht aus der *Vena saphena* im Verlauf einer Inkubation mit einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Perfusionslösung.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung, sollen jedoch nicht als einschränkend aufgefasst werden.

Beispiel 1: Bevorzugtes Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung von isolierten Hohlorganen bzw. biologischen Gefäßen.

Bei einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wurde bei Verwendung von Blutgefäßen eine Perfusionslösung mit folgender Zusammensetzung eingesetzt:

Physiologische Elektrolytlösung mit 127 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,1 mM MgSO₄; 1,2 mM KH₂PO₄; 24 mM Histidin-Cl; 2 mM CaCl. Vor Zugabe von CaCl wurde der pH-Wert der Lösung bei atmosphärischen Luftbedingungen auf pH=7,40 eingestellt. Weiterhin enthielt die Perfusionslösung 10 Vol-% Lipoprotein-freies, hämolysinfreies, homologes Serumpräparat aus einem Pool von Blutpräparaten, 2,5 mM L-Glutamin, 2 mM Na-Pyruvat, 8 mM Glucose, 200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin, niedrigmolekulares Heparin (Fraxiparin von PharmaciaTM; 100 µl/100 ml fertige Lösung) und zusätzlich jeweils 50 µM Harnsäure und Ascorbat.

Bei dem Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung des isolierten biologischen Gefäßes wurde eine Apparatur eingesetzt, welche die Seitenäste des zur Bypass-Prothese gedachten Gefäßes zuverlässig ligieren sollte. Die Apparatur entspricht im Wesentlichen der Figur 1. Diese besteht aus einer Kammer (1) und Silikon-Dichtungsscheiben mit dazwischengelagerten Stahlscheiben aus V2A-Stahl (3), welche mit ihren zentralen Perforationen axial in einer Rändelschraube angeordnet sind. Durch diese Dichtungsvorrichtung wurde das eine Ende einer *Vena saphena* zunächst nur ein kurzes Stück hindurchgezogen und mit einer Klemme verschlossen. Das andere Ende des Gefäßes wurde mit der Kanüle (5) des Stempelteiles verbunden. Die Kanüle ist mit einem Schlauch verbunden, der mit einer Boyle Mariott'sche Flasche (7) verbunden ist. Die Boyle Mariott'sche Flasche enthielt die oben genannte Endothel-protective Perfusionslösung und befand sich ca. 1,30 m oberhalb der Kammer zur Erzeugung eines Druckgradienten (Δp). Durch einen definierten und konstanten Druck wurde die Perfusionslösung aus der Boyle Mariott'sche Flasche durch den Schlauch in die Kanüle und so in die Vene geleitet. Anschließend wurde der axial bewegliche Stempel (6) mit dem vorgeschalteten Blutgefäß

abgedichtet in den Innenraum der Kammer eingeschoben. Unter mäßigem Druck wurde die Endothel-protective Perfusionslösung in das Gefäß appliziert, so dass es zum Ausströmen der Perfusionsflüssigkeit über die Seitenäste des Gefäßes kommen konnte. Um den Ausführungsbereich der Vene gegen den Zylinderinnenraum der Kammer abzudichten, wurde die Rändelschraube im Dichtungsbereich (3) weiter nach Innen geschraubt, so dass das Ausströmen über die in diesem Bereich liegenden Seitenäste rasch unterblieb. Durch weiteres Herausziehen der Vene kam es zum selektiven Ausspritzen von Perfusionslösung aus allen neu heraustretenden Seitenästen, die dann jeweils sofort ligiert werden konnten. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der intimalen Oberfläche wiesen einen vollkommenen Erhalt (100%) der Endothelschicht nach.

Beispiel 2: Regeneration von Endothel-Gewebe der *Vena saphena* durch Behandlung mit der Endothel-konservierender Perfusionslösung

Um die Wirkung der Endothel-protectiven Perfusionslösung und des erfindungsgemäßen Verfahrens zu verdeutlichen, wurden isolierte Endothelzellen aus der menschlichen *Vena saphena* während der Inkubation mit verschiedenen Lösungen mikroskopisch beobachtet und ihr Verhalten wurde durch Serien bzw. Video-Zeitraffer-Mikrophotographie dokumentiert.

Endothelzellen aus kardiochirurgisch nicht mehr benötigten Reststücken der menschlichen *Vena saphena* wurden durch Kollagenase-Inkubation selektiv abgelöst und in Minimal-Essential-Medium (z.B. „Dulbecco minimal essential medium“, DMEM) unter Zusatz von 10% v/v fötalem Kälberserum in Wasserdampf-gesättigter atmosphärischer Luft bei Zufuhr von 5% v/v Kohlendioxid bei einer Temperatur von 37 °C („Brutschrankbedingungen“) bis zur Konfluenz gezüchtet. Anschließend wurden ausgewählte Schalen in ein Inkubationssystem eingebracht, das auf dem Objektisch eines Zeiss-Axiovert-Mikroskops fest montiert war und für die Konstanz der oben bezeichneten Wachstumsbedingungen garantierte. Die kontinuierliche photographische Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer Computer-gesteuerten Zeiss AxioCam-Kamera unter Verwendung von Software die von Zeiss entwickelt wurde und unter Einsatz von Gelblicht mit der geringsten, technisch gerade noch zur Abbildung der jeweiligen Endothelschicht ausreichenden Beleuchtungsstärke. Zwischen den einzelnen, automatisch ausgelösten Einzelaufnahmen wurden die Kulturen durch eine automatisch einfahrbare Blende vom Licht der Mikroskoplampe abgeschirmt.

Zunächst wurden die auf diese Weise präparierten Endothelzellen in herkömmlicher Saline inkubiert (Figur 2; Tafel A; Lösung 1). Die Saline hatte folgende Zusammensetzung: 154 mM (0,9 Gew.-%) NaCl in bidestilliertem Wasser.

Die Aufnahmen dokumentieren den Zustand der Endothelzellen zu verschiedenen Zeiten während der Inkubation mit Saline. Die Ausgangskultur (0 Minuten) zeigte eine intakte Endothelzell-Schicht. Mit vorschreitender Inkubation mit Saline kam es jedoch schon innerhalb weniger Minuten zu einem kugeligen Ablösen der Endothelzellen und zum Absterben von Endothelzellen. Dies führte zu einer völligen Zerstörung des Gewebeverbandes. Nach einer Inkubationszeit von 180 Minuten waren nahezu alle untersuchten Endothelzellen kugelig von der Oberfläche abgelöst und abgestorben.

Im Gegensatz dazu, führte eine Behandlung der isolierten Endothelzellen mit der erfindungsgemäßen Perfusionslösung (Figur 3; Tafel B; Lösung 2), die natives Albumin enthielt, zu einer Erhaltung der Endothelzellen über den gesamten beobachteten Inkubationszeitraum. Allerdings unterblieb in dieser Lösung eine mitotische Aktivität der Endothelzellen.

Die Lösung 2 hatte folgende Zusammensetzung: Physiologische Elektrolytlösung (127 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,1 mM MgSO₄; 1,2 mM KH₂PO₄; 24 mM Histidin-Cl; 2 mM CaCl (pH auf 7,40 vor Zugabe von CaCl); 0,1% Albumin und 2,5 mM L-Glutamin. Die Perfusionslösung enthielt außerdem: 2 mM Na-Pyruvat, 8 mM Glucose, 200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin, niedrigmolekulares Heparin (Fraxiparin von PharmaciaTM: 100 µl/100 ml fertige Lösung) und zusätzlich jeweils 50 µM Harnsäure und Ascorbat.

Die Inkubation der kultivierten Endothelzellen in der Lösung 2 führte zu einer weitgehenden Erhaltung der endothelialen Gewebearchitektur. Insbesondere beobachtete man kein kugeliges Ablösen oder Absterben der Endothelzellen. Nach ca. 180 Minuten stellte sich eine deutliche Weirung der Interzellularspalten zwischen einigen Endothelzellen heraus. Doch zeigt sich, dass die Funktion des Endothelgewebes, insbesondere die Abschirmung subendothelialer Gefäßwandbereiche in dieser Perfusionslösung erhalten bleibt. Somit bewirkt diese erfindungsgemäße, aber noch kein Serum enthaltene Perfusionslösung, eine vollständige Vitalitätserhaltung von Endothelzellen bei gleichzeitiger Erhaltung ihrer wichtigsten Funktion.

In einem weiteren Experiment wurde das Regenerationspotential von Endothelzellen durch die Behandlung mit der erfindungsgemäßen, Serum enthaltenen Perfusionslösung untersucht. Die isolierten und in Kultur gehaltenen Endothelzellen wurden mit einer Perfusionslösung (Figure 4; Tafel C; Lösung 5) behandelt.

Die Lösung 5 hatte folgende Zusammensetzung: Physiologische Elektrolytlösung mit 127 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,1 mM MgSO₄; 1,2 mM KH₂PO₄; 24 mM Histidin-Cl; 2 mM CaCl. Vor Zugabe von CaCl wurde der pH-Wert der Lösung bei atmosphärischen Luftbedingungen auf pH=7,40 eingestellt. Weiterhin enthielt die Perfusionslösung 10 Vol-% Lipoprotein-freies, hämolysinfreies, homologes Serumpräparat aus einem Pool von Blutpräparaten, 2,5 mM L-Glutamin, 2 mM Na-Pyruvat, 8 mM Glucose, 200 U/ml Penicillin und 0,2 mg/ml Streptomycin, niedrigmolekulares Heparin (Fraxiparin von PharmaciaTM: 100 µl/100 ml fertige Lösung) und zusätzlich jeweils 50 µM Harnsäure und Ascorbat.

Im Gegensatz zu Lösung 2, enthält die Lösung 5 homologes Serum statt Albumin. Dies hat, wie nachfolgend gezeigt, nicht nur eine ausgeprägte strukturerhaltende Wirkung auf das Gewebe der Endothelzellen sondern auch eine starke Wirkung auf die Teilungsfähigkeit der kultivierten Endothelzellen.

Bereits nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten in Lösung 5 waren Zellteilungen der Endothelzellen zu beobachten. Die Zellteilungskompetenz der Endothelzellen wurde über den gesamten Untersuchungszeitraum aufrechterhalten. Die Inkubation der Endothelzellen in Lösung 5 führte daher zu einer Proliferation der Endothelzellen und damit auch zur Regenerationsfähigkeit des Endothelzellrasens.

Diese Daten verdeutlichen die Vorteile der erfindungsgemäßen Perfusionslösungen im Vergleich zu der herkömmlich verwendeten Saline-Lösung. Die erfindungsgemäße Perfusionslösung führt einerseits zur Erhaltung von Endothelzell-Gewebe und hat andererseits die Fähigkeit, Endothelzellen zur Teilung anzuregen. Dies ist besonders im Hinblick auf die Regeneration beschädigter Endothel-Schichten bei biologischen Gefäßen vorteilhaft und bei der Vorbereitung bzw. Herstellung von biologischen Gefäßen bzw. Gefäßtransplantaten wünschenswert. Auch hat Perfusionslösung die herausragende Eigenschaft, dass die

biologischen Gefäße bis zu Wochen in der Perfusionslösung aufbewahrt werden kann, ohne dass es hierbei zur Schädigung oder Beeinträchtigung der Endothel-Schicht kommt.

Somit bietet die vorliegende Erfindung eine hervorragende Möglichkeit zur Behandlung und Herstellung von isolierten Hohlorganen und biologischen Gefäßen. Daher eignen sich die mit der erfindungsgemäßen Perfusionslösung behandelten Hohlorgane bzw. biologische Gefäße für den Einsatz als Gefäßprothesen mit langer Lebenszeit. Das heute noch große Risiko einer Restenosierung solcher Prothesen wird zum Wohle der Patienten drastisch eingeschränkt.

Patentansprüche

1. Endothel-protektive Perfusionslösung, umfassend
 - (a) physiologische Elektrolytlösung
 - (b) mindestens 0,1 Gew.-% natives Albumin
 - (c) 0,5 bis 10 mM L-Glutamin
2. Perfusionslösung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das native Albumin durch 1-10 Vol-% hämolysinfreies oder autologes Serum ersetzt wird.
3. Perfusionslösung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das native Albumin durch 2,5 Vol-% hämolysinfreies oder autologes Serum ersetzt wird.
4. Perfusionslösung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das native Albumin durch 5 Vol-% hämolysinfreies oder autologes Serum ersetzt wird
5. Perfusionslösung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das native Albumin durch 10 Vol-% hämolysinfreies oder autologes Serum ersetzt wird
6. Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration von L-Glutamin 2,5 mM beträgt.
7. Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration von L-Glutamin 5 mM beträgt.
8. Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration von L-Glutamin 7,5 mM beträgt.
9. Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass die physiologische Elektrolytlösung folgende Zusammensetzung hat: 100-150 mM NaCl; 1-15 mM KCl; 0,1-4 mM MgSO₄; 0,5-2 mM KH₂PO₄; 24-48 mM Histidin-Cl und 1-3 mM CaCl.

10. Perfusionslösung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die physiologische Elektrolytlösung 2-10 mM Glukose und 1-10 mM Pyruvat enthält.
11. Perfusionslösung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die physiologische Elektrolytlösung 0,1-0,6 U/ml Heparin und/oder jeweils 50-100 μ M Harnsäure und/oder Ascorbat enthält.
12. Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert in der physiologischen Elektrolytlösung in atmosphärischer Luft 7,4 \pm 0,04 beträgt.
13. Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 1-12 dadurch gekennzeichnet, dass die Endothel-protektive Perfusionslösung zusätzlich Antibiotika enthält.
14. Perfusionslösung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Antibiotika um 50-400 U/ml Penicillin und/oder 0,1-0,4 mg/ml Streptomycin handelt.
15. Apparatur zur Endothel-konservierenden Behandlung von isolierten biologischen Gefäßen, umfassend eine Kammer (1), ein axial beweglicher Stempel (6), eine Kanüle (5), ein Vorratsbehälter (7) der Endothel-konservierende Perfusionsflüssigkeit enthält und eine Dichtungsvorrichtung (3), wobei die Kanüle mit dem axial beweglichen Stempel (6) verbunden ist, so dass die Kanüle mit dem Stempel in die Kammer bewegt werden kann und wobei die Dichtungsvorrichtung (3) ein Ende des Gefäßes umschließen kann und die Kanüle mit dem anderen Ende des Gefäßes verbunden werden kann, so dass die Endothel-protektive Perfusionslösung aus dem Vorratsbehälter (7), vorzugsweise unter einem Druckgradienten, selektiv in das biologische Gefäß geleitet werden kann.
16. Apparatur nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichtungsvorrichtung Dichtungsscheiben umfasst, die stapelförmig in einer Rändelschraube angeordnet sind.

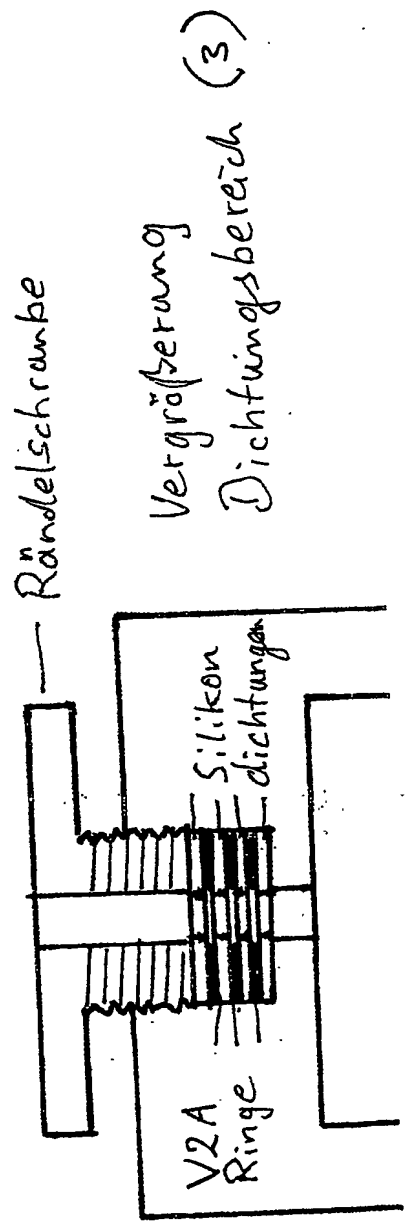
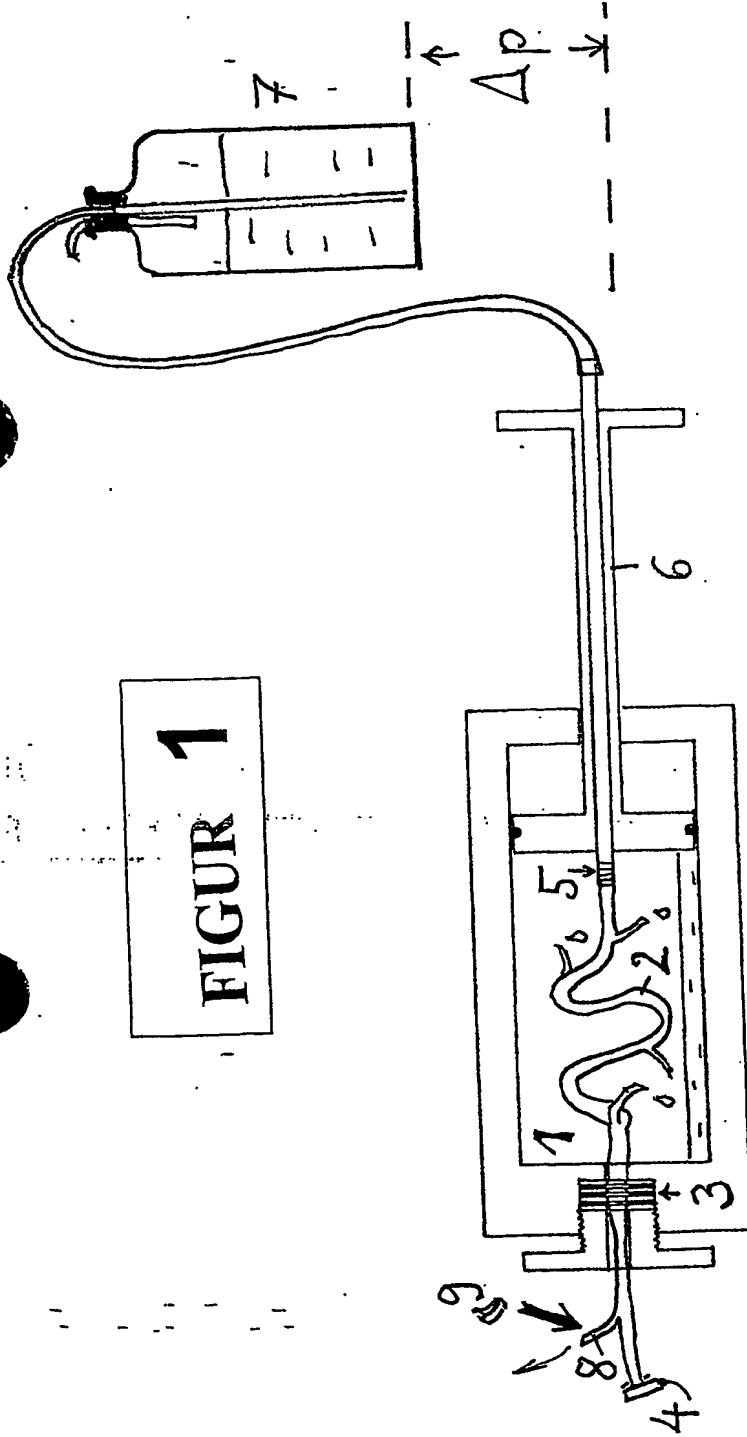
17. Apparatur nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichtungsscheiben einen Durchmesser von 1-10 mm und/oder eine Dicke von 0,3-3 mm haben.
18. Apparatur nach einem der Ansprüche 15-17, dadurch gekennzeichnet, dass die Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 1-14 definiert ist.
19. Apparatur nach einem der Ansprüche 15-18, dadurch gekennzeichnet, dass der Apparat zusätzlich eine Thermostatisierungseinrichtung zum Erwärmen der Perfusionsflüssigkeit enthält.
20. Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung von Hohlorganen, dadurch gekennzeichnet, dass ein Hohlorgan mit einer Endothel-protectiven Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 1-14 durchgespült wird.
21. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Perfusionsflüssigkeit mit Hilfe einer Apparatur nach einem der Ansprüche 15-19 durch das Hohlorgan geleitet wird.
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Hohlorganen um Organgefäßsysteme in Herz, Darm, Uterus, Niere, Harnblase, Lunge, Leber, Milz handelt.
23. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Hohlorganen um biologische Gefäße handelt.
24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den biologischen Gefäßen um Blutgefäße oder Lymphgefäße handelt.
25. Verwendung der Endothel-protectiven Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 1-14 zur Vorbereitung von biologischen Gefäßen als Transplantat für die Behandlung von Gefäßerkrankungen.

26. Verwendung der Endothel-protectiven Perfusionslösung nach einem der Ansprüche 1-14 zur Reparatur von Endothelläsionen in isolierten Hohlorganen oder biologischen Gefäßen.

ZUSAMMENFASSUNG

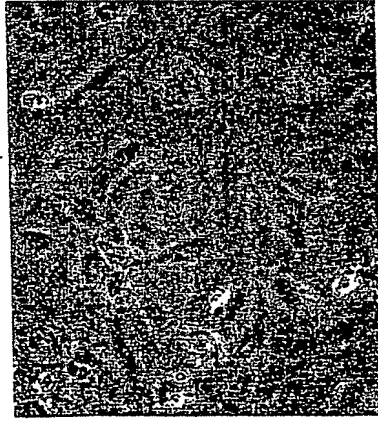
Die Erfindung betrifft eine Endothel-protektive Perfusionslösung, eine Apparatur und ein Verfahren zur Endothel-konservierenden Behandlung von isolierten Hohlorganen, insbesondere isolierten biologischen Gefäßen, wie Blutgefäßen und Lymphgefäßen, sowie die Verwendung der Endothel-protektive Perfusionslösung zur Vorbereitung von Hohlorganen bzw. biologischen Gefäßen als Transplantat zur Behandlung von Organ- oder Gefäßerkrankungen und die Verwendung der Endothel-protektiven Perfusionslösung zur Reparatur von Endothelläsionen in isolierten Hohlorganen und/oder biologischen Gefäßen.

FIGUR 1



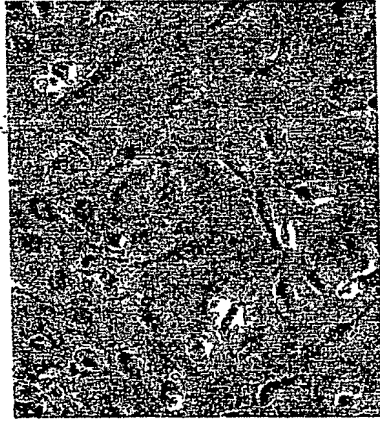
Tafel A: Kultivierte Endothelschicht aus der Vena Saphena im
Verlauf einer Inkubation mit Saline (Lösung 1)

Figur 2

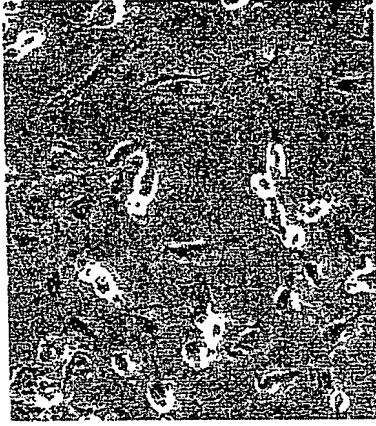


0 Minuten

(unmittelbar vor
Zugabe von Saline)



nach 2 Minuten



nach 4 Minuten



nach 6 Minuten



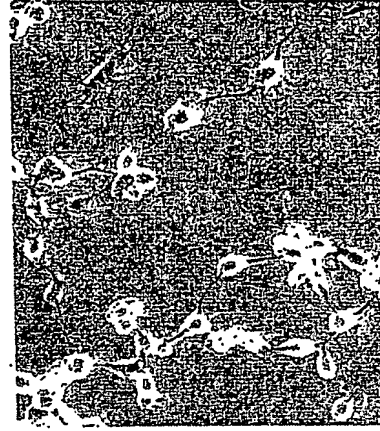
nach 8 Minuten



nach 30 Minuten



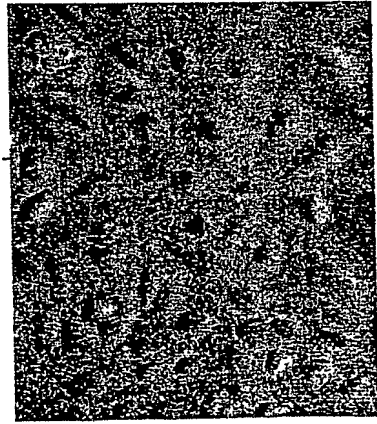
nach 60 Minuten



nach 180 Minuten

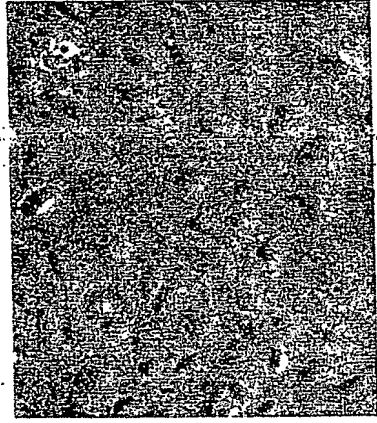
Tafel B: Kultiviertes Vena Saphena-Endothel in Lösung 2

Figur 3

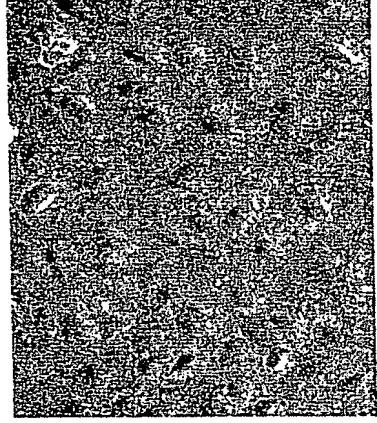


0 Minuten

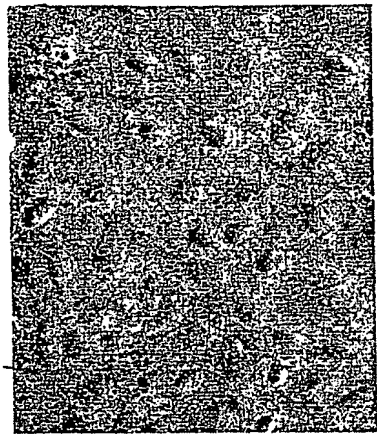
(unmittelbar vor Zugabe von
Lösung 2)



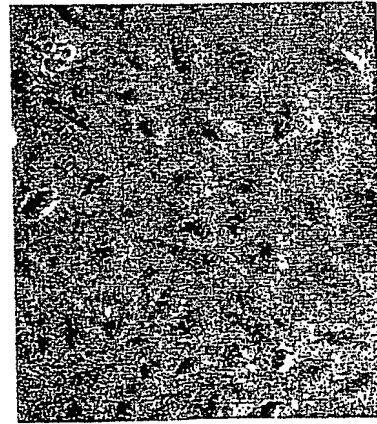
nach 2 Minuten



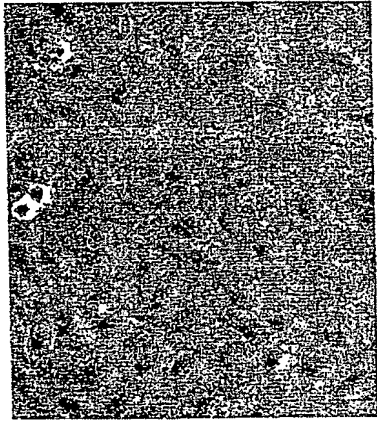
nach 4 Minuten



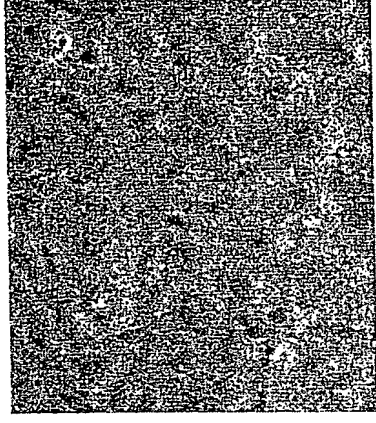
nach 6 Minuten



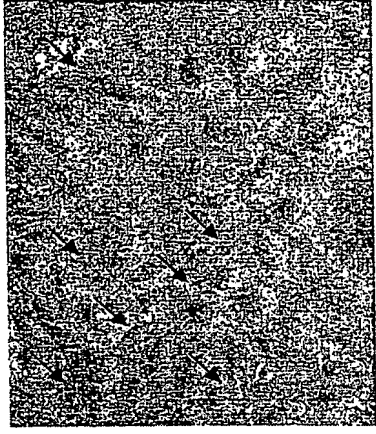
nach 8 Minuten



nach 30 Minuten



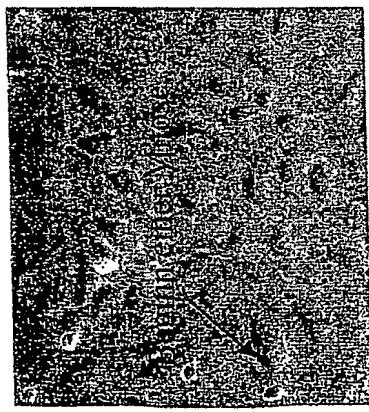
nach 60 Minuten



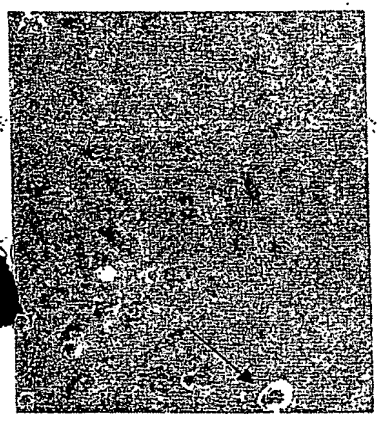
nach 180 Minuten

(deutliche Weitung der
Interzellularspalten, Pfeile!)

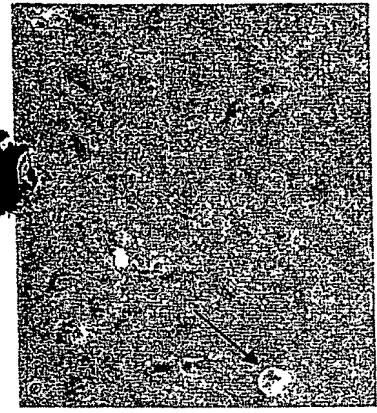
Fig. 4 Tafel C: Kultiviertes Vena sapnena-Endothel in Lösung



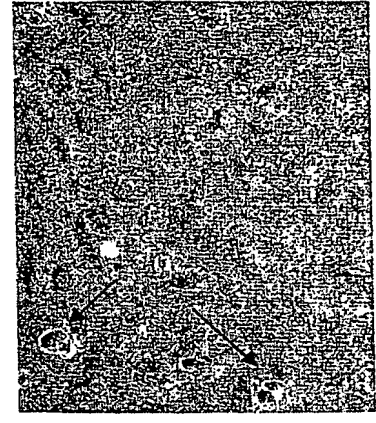
0 Minuten



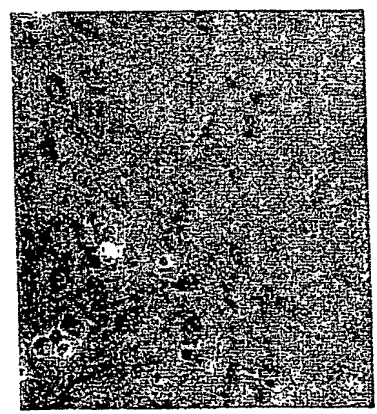
nach 30 Minuten



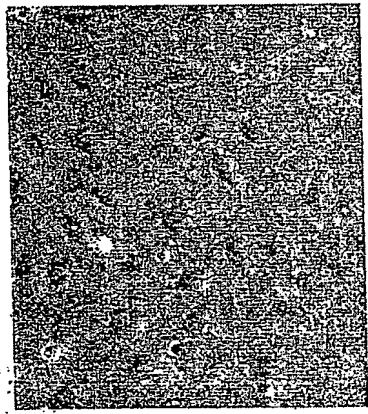
nach 70 Minuten



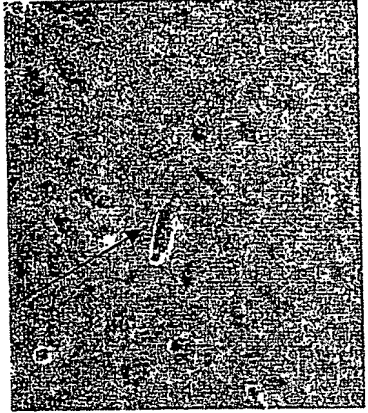
nach 130 Minuten



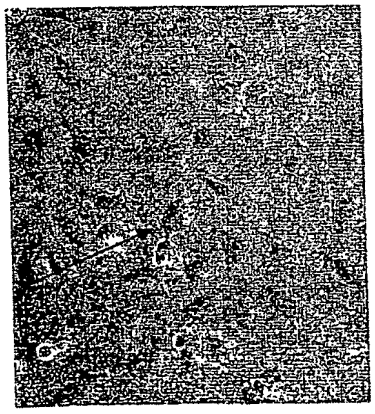
nach 150 Minuten



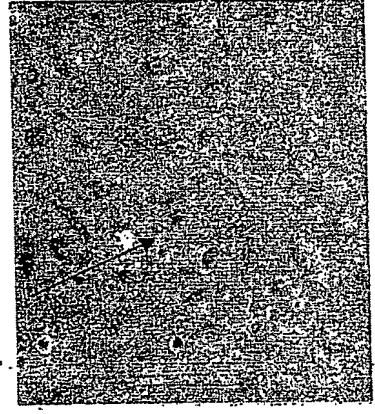
nach 175 Minuten



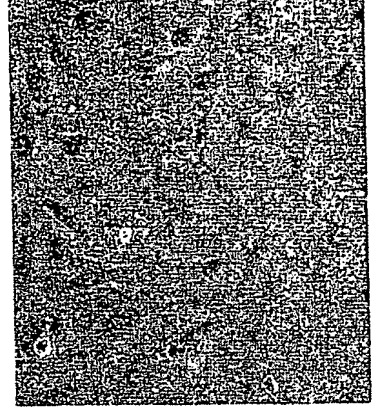
nach 225 Minuten



nach 230 Minuten



nach 270 Minuten



nach 300 Minuten

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.